

## 遺伝子破壊変異イネを用いたサイトゾル型グルタミン合成酵素1;1の機能解析

著者	田淵 真由美
号	856
発行年	2005
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16167">http://hdl.handle.net/10097/16167</a>

氏 名(本籍)	た 田      ぶち 淵      ま ゆ み 真 由 美
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )
学 位 記 番 号	農 博 第 8 5 6 号
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	遺伝子破壊変異イネを用いたサイトゾル型グルタミン合成酵素 1；1 の機能解析
論文審査委員	(主 査) 教 授 山 谷 知 行 (副 査) 教 授 西 尾 剛 教 授 前 忠 彦

# 論文内容要旨

## 遺伝子破壊変異イネを用いたサイトゾル型グルタミン合成酵素 1;1 の機能解析

### 序論

窒素は、最も不足しやすい必須元素であり、植物の成育を直接支配する重要な因子の一つである。主要穀物であるイネの穂を構成している窒素の約 80% は、老化器官から篩管を介して輸送される窒素に由来しており (Mae and Ohira, 1981)、篩管を流れる転流窒素の主形態はグルタミンおよびアスパラギンである (Hayashi and Chino, 1990)。この窒素転流には、老化葉身におけるサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1; EC 6.3.1.2) と若い成長中の器官における NADH グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14) が重要な機能を担っていることが示唆されてきた (Kamachi *et al.*, 1991; Kamachi *et al.*, 1992; Yamaya *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1993; Hayakawa *et al.*, 1994; Sakurai *et al.*, 1996)。しかし、GS1 がこの機能を担っているという直接的な証明はなされていない。

生理機能の直接的な証明には、標的遺伝子が欠損した変異体の利用が必須である。プラスチド型の GS2 の主な生理機能は、光呼吸で放出されたアンモニアの再同化であることが、オオムギの GS2 遺伝子欠損変異体を用いた解析から明らかにされた (Wallsgrrove *et al.*, 1987)。植物における変異体を用いた研究は、順遺伝学的に表現型の違いからスクリーニングし、原因遺伝子を特定すると方法と、主にシロイヌナズナで整備された T-DNA タグラインを用いて、標的遺伝子が破壊されたラインを獲得する、いわゆる逆遺伝学的アプローチがある。しかし、GS1 遺伝子の欠損変異体に関する報告は、シロイヌナズナでもない。

近年、イネゲノムプロジェクトにより内在性レトロトランスポゾン *Tos17* を転移させた遺伝子破壊系統群が作出され、目的遺伝子に *Tos17* が挿入された系統を選抜することが可能となった。

本研究では、イネにおける GS1 の生理機能を、GS1 遺伝子欠損変異体を用いて明らかにすることを目的とした。まず、第 1 章では遺伝子破壊変異体の獲得を行い、第 2 章では得られた *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体を詳細に解析した。さらに、第 3 章では、*OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体を用いて、GS1;1 の機能を探った。

## 第1章 GS1 遺伝子破壊変異体の獲得

本章では、イネの GS1 の遺伝子破壊変異体の獲得を試みた。

イネにおける GS1 cDNA は、shoot GS1 と root GS1 の2種が単離されていた(Sakamoto *et al.*, 1989)。ゲノム配列の解読が完了したイネゲノムデータベースを検索したところ、新たにサイトゾル型 GS 遺伝子を発見した。そこで、従来の shoot GS1 遺伝子を *OsGS1;1*、root GS1 遺伝子を *OsGS1;2* と改名し、新たに見いだした GS1 遺伝子を *OsGS1;3* と命名した。*OsGS1;3* cDNA をクローニングし、RT-PCR により3種の *OsGS1* mRNA の蓄積を調べた。その結果、*OsGS1;1* mRNA、*OsGS1;2* mRNA は、供試した幼植物の根、葉鞘、未抽出葉身、完全展開葉身、老化葉身、開花後5日目の穎果全てに検出されたのに対し、*OsGS1;3* mRNA は、穎果でのみ検出された。

イネゲノムプロジェクトにより、公開されている *Tos17* の隣接配列のデータベースを検索し、*OsGS1;1* の第8 exon に *Tos17* が挿入された系統 (ND8037) を見いだした。また、DNA pool に対する PCR スクリーニングの結果、新たに *OsGS1;1* 第8 exon (ND8901)、第10 exon (NC2373)、第4 intron (NF1130)、第10 intron (NC0866) に *Tos17* が挿入されている系統を見いだした(Fig. 1A)。このうち、exon に *Tos17* が挿入されている系統について解析を行った。*OsGS1;1* 遺伝子上に *Tos17* が挿入された対立遺伝子が heterozygote になった個体(+/-)や、*OsGS1;1* 遺伝子上の *Tos17* が脱落した個体(+/+)は、野生型と同様に成育した。これに対して、*OsGS1;1* 遺伝子上に *Tos17* が挿入された対立遺伝子が homozygote になった *OsGS1;1* 破壊変異体(-/-)は、成育の遅延や稔実率の低下が認められた(Fig. 1B - 1E, Table 1)。

*OsGS1;1* 上に *Tos17* が挿入された *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体を獲得し、この変異体は成育が極端に遅延するという表現型を示すことが明らかになった。

## 第2章 *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異イネの特徴

第1章で得られた *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異イネの特徴を明らかにした。

*OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体では、葉身、葉鞘および根の GS1 含量が減少していた(Fig. 2B)。また、変異体の完全展開葉身から抽出した可溶性タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーにて分離し、GS transferase 活性を測定したところ、GS1 活性も野生型と比較して著しく減少していた(Fig. 2C)。*OsGS1;1* 破壊変異体の葉身、葉鞘、根を供試して real time RT-PCR 解析を行った結果、正常な

*OsGS1;1* mRNA は検出されなかった。一方、*OsGS1;2* mRNA は、供試した全ての器官で野生型と同程度検出された(Fig. 3)。機能相補を目的に、ササニシキの *OsGS1;1* promoter 領域に *OsGS1;1* cDNA を連結したキメラ遺伝子を、heterozygote (+/-) に導入した形質転換イネを作出した。この自殖種子である T1 世代を栽培した結果、*OsGS1;1* cDNA が導入された形質転換体は、変異体で認められた成育の遅延などの表現型が回復し、野生型と同様に成育した(Fig. 4)。このことから、変異体で認められた表現型は、GS1;1 が欠損していることに起因していると結論した。

*OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体が正常に成育できないことから、GS1;1 の生理機能の中には、他の GS1 や他の代謝系では補いきれない機能があることが明らかになった。

### 第3章 *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異イネを用いた GS1;1 の機能解析

第2章で示した他の GS1 や他の代謝系では相補できない GS1;1 の機能は、いくつか可能性が考えられる。まず、これまで GS1 の機能として示唆されている、転流窒素の Gln を老化葉身において合成するという機能を GS1;1 が担っており、変異体では、転流が滞り正常に成育できない可能性が予想される。また、根における窒素初期同化過程において、アンモニウムイオン投与後の mRNA の蓄積量の推移や、mRNA の蓄積部位には、GS1;1 と、GS1;2 では違いがあることが判明しており (Ishiyama *et al.*, 2004)、それぞれ、異なる役割を担っている可能性が考えられる。この、GS1;1 の機能を解明するため、*OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体をより詳細に解析した。

窒素初期同化過程における GS1;1 の機能を解析するにあたり、変異体に与える窒素源を変化させて栽培した。変異体を、播種直後から、3種類の窒素源の水耕液でそれぞれ栽培すると、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の存在する、塩化アンモニウム条件と硝酸アンモニウム条件では、第4葉が短くなり、葉身の抽出に遅延が認められた。これに対し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>のみの硝酸ナトリウム条件では、野生型に近い成育を示した(Fig. 5)。また、種子栄養期に水のみで栽培すると、変異体は野生型と同様に成育した(Fig. 6)。

種子栄養期に水のみで栽培し、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>投与後 48 時間の変異体の第3葉身、第3葉鞘および、根のアミノ酸蓄積量を測定した。変異体では野生型と比較して、グルタミンが減少しており、これに伴って、総アミノ酸含量も減少していた。また、このとき、アンモニウム蓄積量は、野生型に比較して、変異体で増加していた(Table 2)。これらのことから、変異体で認められた表現型は NH<sub>4</sub><sup>+</sup>存在条件下で生じているが明らかになった。

播種直後から塩化アンモニウムを窒素源とした水耕液を与えて播種後 18 日目まで栽培した、変

異体と野生型の葉身を切片化し、組織を観察した。その結果、変異体は組織が正常に発達していなかった。

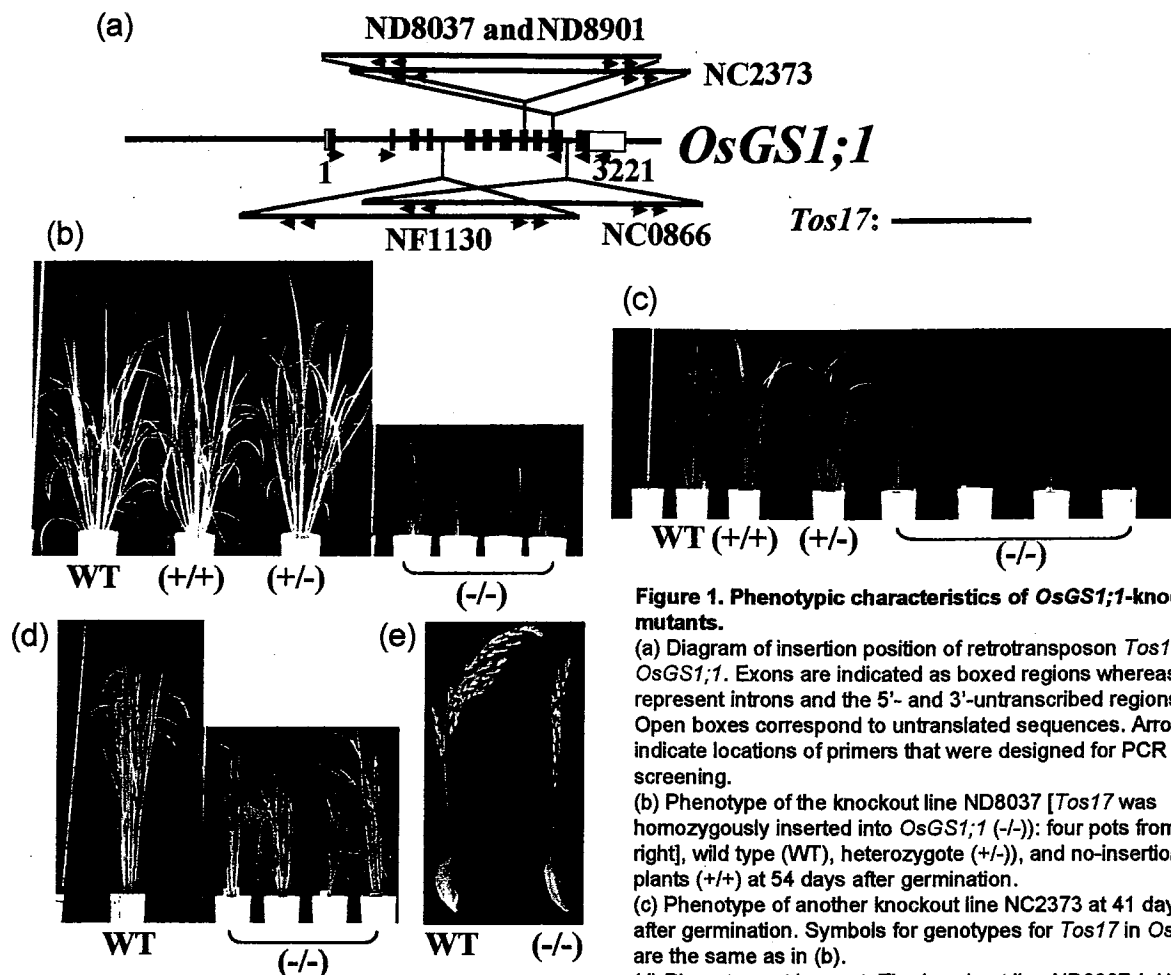
変異体と野生型を、播種直後から塩化アンモニウムを窒素源とした水耕液を与えて播種後 18 日目まで栽培した時の転写産物蓄積量の違いを、マイクロアレイを用いて解析した。第 3 葉身、第 3 葉鞘、根に分けて、それぞれ、変異体と野生型の転写産物蓄積量を比較した結果、マイクロアレイチップ上の約 21500 遺伝子のうち P value 0.01 以下の有意な増減が認められた遺伝子数は、葉身で 627 (うち増加 299、減少 328)、葉鞘で 411 (うち増加 232、減少 179)、根で 1100 (うち増加 483、減少 617) であった (Fig. 7)。また、このうち、発現強度比 3 倍以上の増減が認められた遺伝子数は、葉身で 67 (うち増加 17、減少 50)、葉鞘で 35 (うち増加 28、減少 7)、根で 98 (うち増加 56、減少 42) であった。詳細は現在解析中である。

*OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体が、特に  $\text{NH}_4^+$  存在条件下で正常に成育できないことから、GS1;1 の生理機能には、他の代謝系では完全には相補できない部分があることが判明し、イネの根における  $\text{NH}_4^+$  同化において GS1;1 は極めて重要な役割を担っていることが明らかとなった。

## 結論

本研究で、以下のことが明らかになった。

1. これまで他のいかなる植物でも報告の無かった、サイトゾル型グルタミン合成酵素の欠損変異体である、*OsGS1;1* 遺伝子破壊変異イネを獲得した。*OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体は、遺伝子破壊系統群より、*OsGS1;1* 遺伝子上にレトロトランスポゾン *Tos17* が挿入された 5 系統見いだした。変異体は、成育が遅延し、稔実率が著しく低下した。
2. *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体は、正常な *OsGS1;1* mRNA が蓄積しておらず、GS1 タンパク質が減少し、GS1 活性が低下していた。変異体に *OsGS1;1* promoter 制御下で、*OsGS1;1* cDNA を導入したところ、成育が遅延するなどの表現型は回復し、野生型と同様に成育した。このことから、変異体で認められた表現型は、GS1;1 が欠損していることに起因していると結論した。
3. *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体が、特に  $\text{NH}_4^+$  存在条件下で正常に成育できないことから、GS1;1 の生理機能には、他の代謝系では完全には相補できない部分があることが判明し、イネの  $\text{NH}_4^+$  同化において GS1;1 は極めて重要な役割を担っていることが明らかとなった。



**Figure 1. Phenotypic characteristics of *OsGS1;1*-knockout mutants.**

(a) Diagram of insertion position of retrotransposon *Tos17* in *OsGS1;1*. Exons are indicated as boxed regions whereas lines represent introns and the 5'- and 3'-untranscribed regions. Open boxes correspond to untranslated sequences. Arrows indicate locations of primers that were designed for PCR screening.

(b) Phenotype of the knockout line ND8037 [*Tos17* was homozygously inserted into *OsGS1;1* (-/-)]: four pots from the right, wild type (WT), heterozygote (+/-), and no-insertion null plants (+/+) at 54 days after germination.

(c) Phenotype of another knockout line NC2373 at 41 days after germination. Symbols for genotypes for *Tos17* in *OsGS1;1* are the same as in (b).

(d) Phenotype at harvest. The knockout line ND8037 (-/-) and the wild type were grown for 140 and 132 days after germination, respectively.

(e) Phenotype of panicle and spikelet on a main stem of the knockout line ND8037 (-/-) and wild type.

The red and white areas of the scale bar in (b)-(d) are 10 cm, respectively.

**Table 1 Reduction of productivity in the *OsGS1;1*-knockout mutant**

Line	Spikelet number on a main stem (number/panicle)	Fertility (%)	One spikelet weight (mg)
Wild type (n = 4)	62 ± 10	92 ± 10	24.4 ± 0.5
Homozygote (n = 8)	26 ± 11	2 ± 4	17.3 ± 0.5
Heterozygote (n = 4)	67 ± 5	86 ± 10	24.0 ± 0.3
null (n = 3)	68 ± 12	90 ± 10	23.7 ± 0.7

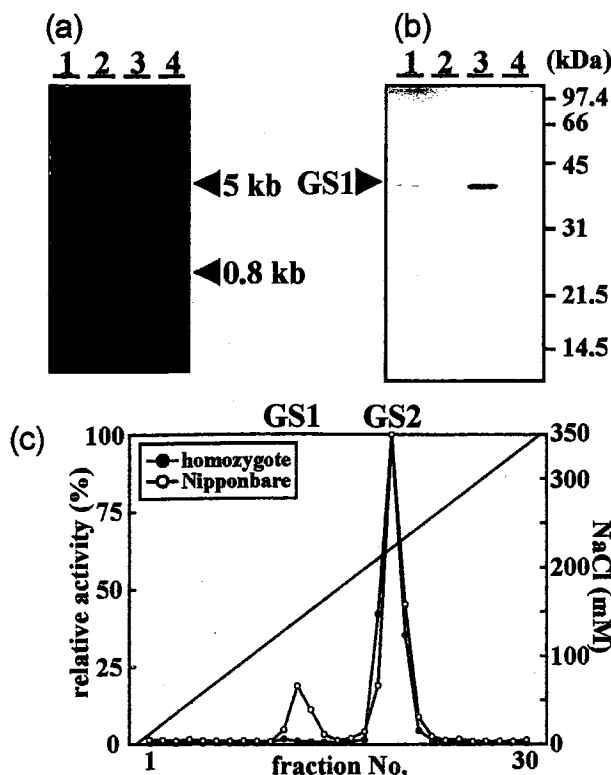
All lines were grown in soil until full maturity. The wild-type Nipponbare, heterozygote, and no insertion null lines were harvested at 112 days after planting, whereas the homozygote was allowed to grow for 140 days. Fertility was determined using spikelets on a main stem and spikelet weight was measured using the superior spikelet. Values are mean ± SD.

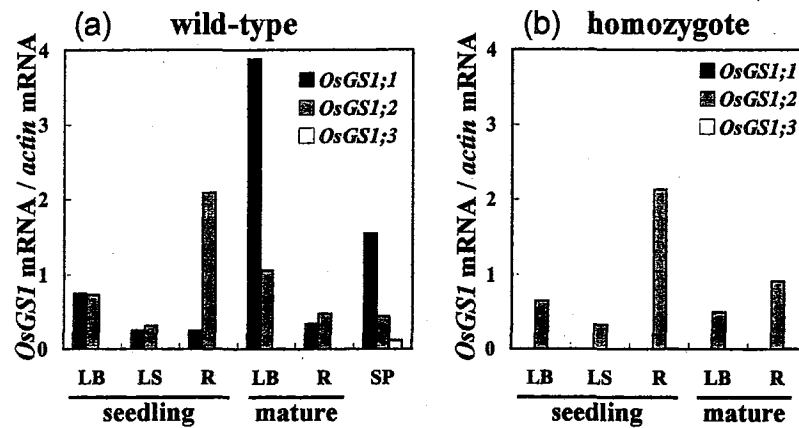
**Figure 2. Analyses of gene products from *OsGS1;1*-knockout mutants.**

(a) RT-PCR detection of *OsGS1;1* mRNA from roots (lanes 1 and 3) and leaf blades (lanes 2 and 4) in 26-day-old seedlings of the wild type (lanes 1 and 2) and homozygote lines (lanes 3 and 4).

(b) Immunodetection of GS1 protein in extract from mature leaf blades (lanes 1 and 2) and leaf sheaths (lanes 3 and 4) of 26-day-old seedlings. We separated 5 lg of soluble protein in crude extract prepared from the wild type (lanes 1 and 3) and homozygote lines (lane 2 and 4). Affinity-purified anti-GS1-peptide IgG was used for immunoblotting.

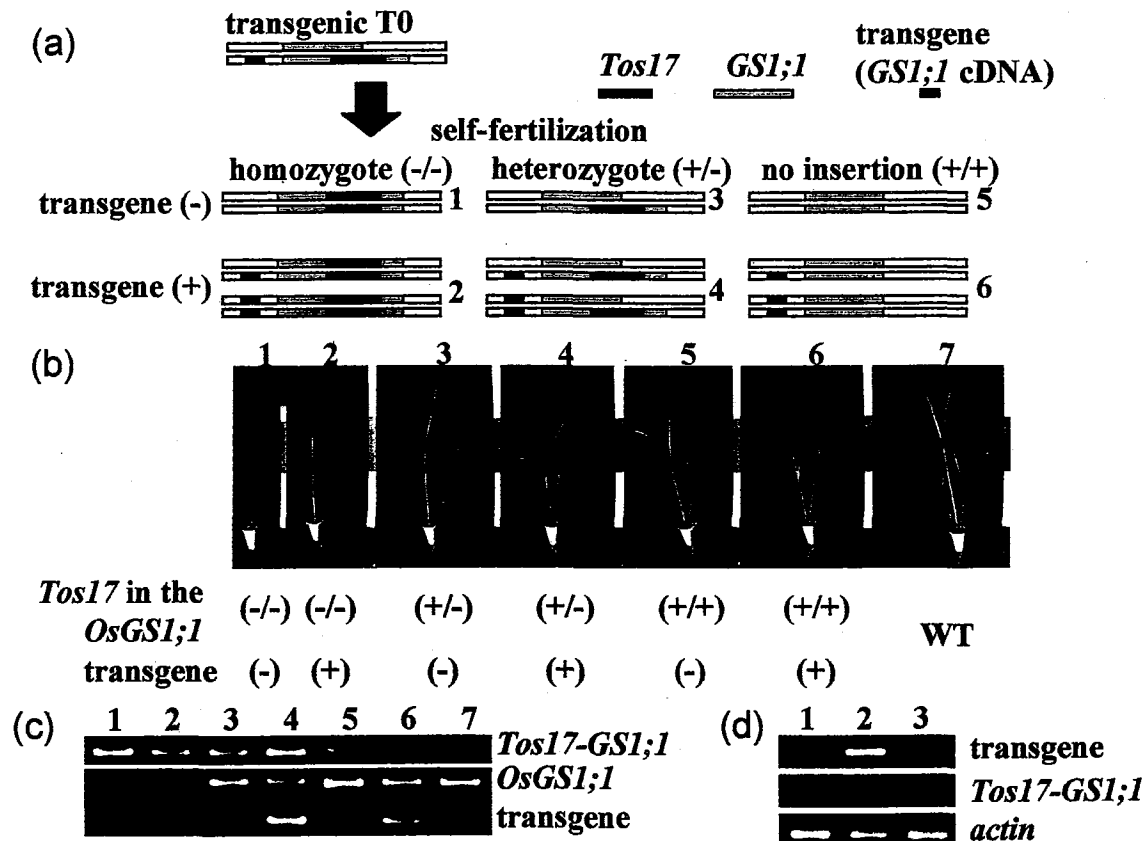
(c) Elution profiles of GS1-semisynthetic activity of extracts from the leaf blades of 26-day-old seedlings. Total activities loaded on the anion-exchange column were 191 and 123 nkat for wild type (open circle) and homozygote lines (filled circle), respectively.





**Figure 3.** Accumulation of *OsGS1;1*, *OsGS1;2*, and *OsGS1;3* mRNAs in wild type and *OsGS1;1*-knockout rice plants. Quantitative real-time PCR was performed using gene-specific primers and values were normalized relative to the values of *actin* mRNA in each organ, as described in Experimental procedures.

(a) Accumulation of *OsGS1;1* (black bars), *OsGS1;2* (hatched bars), and *OsGS1;3* (open bars) mRNAs in leaf blades (LB), leaf sheaths (LS), and roots (R) of 24-day-old seedlings (seedling) or in those at the eighth position of the ninth leaf stage of rice (mature) grown hydroponically, and spikelet (SP) at 5 days after flowering. (b) Accumulation of *OsGS1;1* (black bars), *OsGS1;2* (hatched bars), and *OsGS1;3* (open bars) mRNAs in the *OsGS1;1*-knockout. Samples were of the same age as in (a).



**Figure 4.** Complementation of knockout mutants by introduction of *OsGS1;1* cDNA.

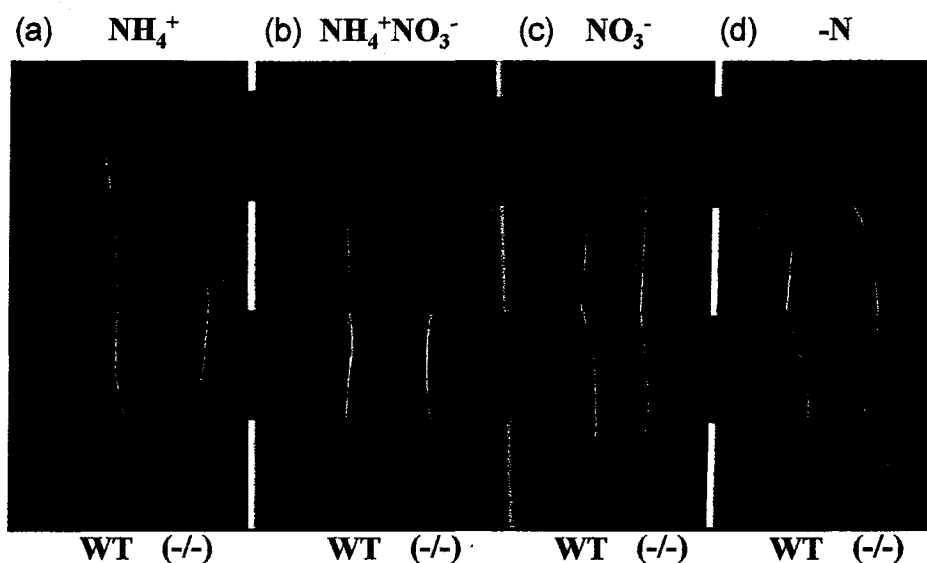
(a) Diagrammatic representation of various genotypes. Terms of homozygote, heterozygote or no insertion are used for the *Tos17* inserted into endogenous *OsGS1;1*. Transgene (+) indicates the presence of *OsGS1;1*-promoter::*OsGS1;1* cDNA in progeny. Arabic numbers correspond to those in Figure 3b,c.

(b) Comparison of phenotype of self-pollinated progeny after transformation. *OsGS1;1* cDNA under the control of its own promoter was introduced into heterozygote lines. Progeny with [transgene (+)] or without [transgene (-)] were compared in their phenotype with wild type (WT) after 26-day growth.

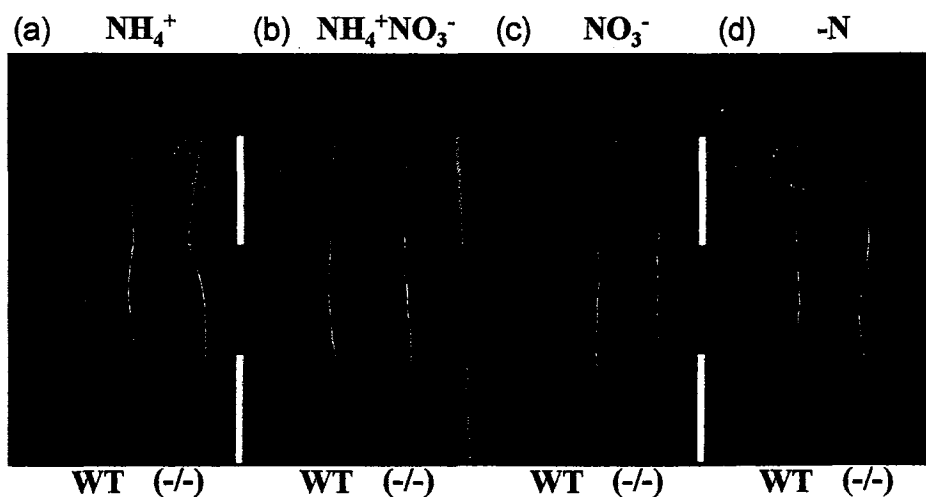
(c) Confirmation of the presence or absence of *Tos17*-containing *OsGS1;1* structural gene (upper panel), that of native *OsGS1;1* structural gene, and the transgene, *OsGS1;1*-promoter::*OsGS1;1* cDNA (lower panel) in progeny. Lane 1, homozygote on *Tos17* without *OsGS1;1*-cDNA transgene; lane 2, homozygote with *OsGS1;1* cDNA; lane 3, heterozygote without *OsGS1;1* cDNA; lane 4, heterozygote with *OsGS1;1* cDNA; lane 5, no insertion without *OsGS1;1* cDNA; lane 6, no insertion with *OsGS1;1* cDNA; lane 7, wild type.

(d) Confirmation of expression of transgene in homozygote (upper panel) with RT-PCR. Expression of *Tos17*-inserted *GS1;1* was also confirmed in homozygote (middle panel). *Actin* mRNA was determined as a positive control (lower panel). Lane 1, homozygote on *Tos17* without *OsGS1;1* cDNA-transgene; lane 2, homozygote with *OsGS1;1* cDNA; lane 3, wild type. PCR was carried out using a suitable set of primers, as described in Experimental procedures. The red and white areas of the scale bar in (b) are 10 cm.





**Figure 5. Phenotype *OsGS1;1*-knockout rice plants at 18-day-old seedlings grown with various form of nitrogen**  
 Wild-type rice (WT) and the *OsGS1;1* knockout mutants (-/-) were grown in nutrient solution for 18 days after germination.  
 (a) 1.0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (b) 1.0 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (c) 1.0 mM  $\text{NaNO}_3$  (d) No nitrogen

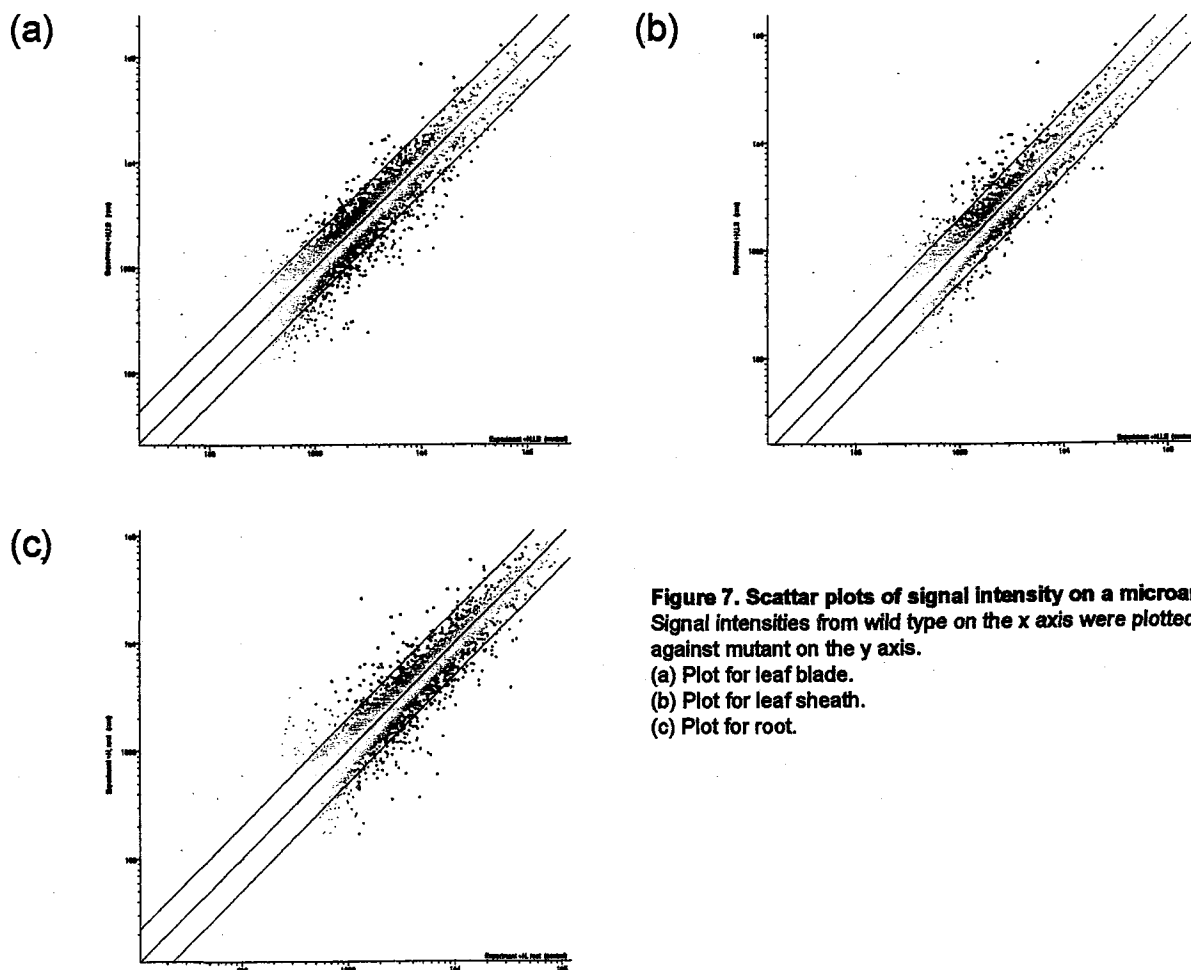


**Figure 6. Phenotype *OsGS1;1*-knockout rice plants at 18-day-old seedlings grown without nitrogen for the first 16 days**  
 Wild-type rice (WT) and the *OsGS1;1* knockout mutants (-/-) were grown in water for 11 days after germination and in nutrient solution without nitrogen for another 5 days. Then, nitrogen was supplied to the nutrient solution and the seedlings were grown for another 48 h.  
 (a) 1.0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (b) 1.0 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (c) 1.0 mM  $\text{NaNO}_3$  (d) No nitrogen

**Table 2 Comparison of free amino acids in roots and leaves of wild type with those of *OsGS1;1* knockout mutants Amino acids**

	Root		Leaf blade		Leaf sheath	
	Wild type	Homozygote	Wild type	Homozygote	Wild type	Homozygote
Gln	3.99 ± 0.83	2.54 ± 0.10	21.7 ± 6.67	8.13 ± 1.22	20.2 ± 7.91	17.7 ± 3.04
Glu	0.19 ± 0.06	0.39 ± 0.25	2.24 ± 0.41	2.58 ± 0.11	0.38 ± 0.18	0.72 ± 0.02
Asn	6.94 ± 0.78	5.80 ± 0.29	11.8 ± 2.14	8.62 ± 0.08	9.81 ± 3.36	14.6 ± 4.36
Asp	0.52 ± 0.06	0.58 ± 0.07	2.11 ± 0.14	1.56 ± 0.15	1.20 ± 0.34	1.95 ± 0.05
Ser	0.55 ± 0.07	0.90 ± 0.09	1.19 ± 0.13	1.45 ± 0.02	1.88 ± 0.62	4.01 ± 0.11
Gly	0.13 ± 0.05	0.07 ± 0.03	3.05 ± 0.64	3.32 ± 0.24	0.92 ± 0.39	1.99 ± 0.41
Ala	0.75 ± 0.15	0.81 ± 0.04	4.75 ± 0.63	9.55 ± 2.06	1.52 ± 0.59	2.89 ± 1.46
Tyr	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.15 ± 0.03
Phe	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.12 ± 0.03
Lys	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.05	0.63 ± 0.09	0.44 ± 0.06	0.17 ± 0.06	0.31 ± 0.03
Thr	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	1.18 ± 0.15	1.04 ± 0.08	0.59 ± 0.20	1.07 ± 0.02
Met	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.01
Val	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.21 ± 0.07	0.44 ± 0.11
Leu	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.05	2.34 ± 0.33	2.18 ± 0.00	0.32 ± 0.12	0.23 ± 0.04
Ileu	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01
Pro	1.25 ± 0.16	1.51 ± 0.36	3.34 ± 0.21	3.77 ± 0.26	1.33 ± 0.37	2.54 ± 0.32
Arg	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.08	1.22 ± 0.11	0.65 ± 0.04	1.09 ± 0.39	1.60 ± 0.24
Cys	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.04	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00
His	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.05	0.20 ± 0.01
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1.64 ± 0.06	2.42 ± 0.04	0.78 ± 0.11	0.94 ± 0.01	0.66 ± 0.13	1.61 ± 0.22

Amino acid contents are  $\text{fmol g}^{-1}$  FW with SD. Triplicate independent samples were used for the extraction of free amino acids. Wild-type rice and the *OsGS1;1* knockout mutants were grown in water for 17 days after germination and in nutrient solution without nitrogen for another 5 days. Then, 1.0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was supplied to the nutrient solution and the seedlings were grown for another 48 h.



**Figure 7. Scatter plots of signal intensity on a microarray**  
Signal intensities from wild type on the x axis were plotted against mutant on the y axis.  
(a) Plot for leaf blade.  
(b) Plot for leaf sheath.  
(c) Plot for root.

## 論文審査結果要旨

世界三大作物の一つであるイネの、穂を構成している窒素の約 80%は老化器官からの転流に依存しており、この窒素転流はイネの生産性にとって極めて重要である。篩管を介して転流される窒素の主な形態はグルタミン (Gln) とアスパラギン (Asn) であり、この Asn は Gln から合成される。従って、老化器官からの窒素転流には、まず Gln の合成が必要である。これまで、Gln の合成にはサイトゾル型のグルタミン合成酵素 (GS1) が関わる示唆を、主に組織内の局在性から論議してきたが、その証明には至っていなかった。

本研究は、GS1 の機能を証明すべく、GS1 遺伝子にレトロランズボゾン *Tos17* が挿入された遺伝子破壊変異体を選抜し、この変異体の表現型や窒素代謝関連酵素遺伝子の発現解析を詳細に行うと共に、変異体に GS1cDNA を GS1 プロモーターの制御下で導入して機能相補を行い、GS1 機能の証明を試みたものである。

得られた結果は、次のように要約できる。①イネゲノムプロジェクトミュータントパネルから、GS1 遺伝子のエキソンに *Tos17* が挿入された変異体を 3 種類選抜した。②この過程で、新規な GS1 を発見し、従来の GS1 遺伝子を *OsGS1;1*、GSr を *OsGS1;2*、新規な GS1 を *OsGS1;3* と命名し、発現解析を詳細に行った。③ *OsGS1;1* 遺伝子破壊変異体の成育調査を詳細に行った。④変異体に *OsGS1;1* プロモーター：*OsGS1;1cDNA* を導入し、機能が相補されることを証明した。⑤野生株と変異体を用いて、遊離アミノ酸を定量し、Gln プールの減少と Glu やアンモニウムイオンプールの増加を確認した。⑥変異体が、アンモニウムイオンに応答して成育抑制されることが判明した。⑦野生株と変異体を用いてトランスクリプトーム解析を行った。GS1 遺伝子破壊変異体の獲得は、維管束植物では初めての例であり、上記の①から⑤をまとめ、その成果を学術雑誌に公表した。

以上、本研究の成果は、世界で初めて GS1 の機能を証明したもので、国内外から非常に高い評価を得た。トランスクリプトーム解析のデータの詳細は、現在解析中であるが、新規な情報が得られる可能性が高い。また、現在、この変異体を用いたメタボローム解析も進行中で、アンモニウムイオンの初期同化過程における新たな展開が期待できる。

本研究は、イネの生産性に直接関わる窒素転流の分子機構の重要な点を初めて証明したもので、インパクトの高い研究である。審査員一同は、本論文提出者に対し、博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。